

5-23-2012

Biocompatible scaffold for sensing proteins

Z. Ryan Tian

University of Arkansas, Fayetteville

Follow this and additional works at: <http://scholarworks.uark.edu/pat>

Recommended Citation

Tian, Z. Ryan, "Biocompatible scaffold for sensing proteins" (2012). *Patents Granted*. Paper 299.
<http://scholarworks.uark.edu/pat/299>

This Patent is brought to you for free and open access by ScholarWorks@UARK. It has been accepted for inclusion in Patents Granted by an authorized administrator of ScholarWorks@UARK. For more information, please contact scholar@uark.edu.



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101646401 B

(45) 授权公告日 2012.05.23

(21) 申请号 200780049756.3

(22) 申请日 2007.09.17

(30) 优先权数据

11/653,192 2007.01.12 US

11/653,189 2007.01.12 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.07.13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/078634 2007.09.17

(87) PCT申请的公布数据

WO2008/088588 EN 2008.07.24

(73) 专利权人 阿肯色州大学理事会

地址 美国阿肯色州

(72) 发明人 Z.·瑞恩·田

(74) 专利代理机构 深圳市顺天达专利商标代理有限公司 44217

代理人 郭伟刚

(51) Int. Cl.

A61F 2/28 (2006.01)

(56) 对比文件

US 6503831 B2, 2003.01.07, 全文.

US 6914279 B2, 2005.07.05,

Thomas J. Webster et al.. Increased osteoblast function on PLGA composites

containing nanophase titania. 《J Biomed Mater Res》. 2005, 第 74A 卷 677-686.

Emmanuel Topoglidis et al. Direct electrochemistry and nitric oxide interaction of heme proteins adsorbed on nanocrystalline tin oxide electrodes. 《Langmuir》. 2003, 第 19 卷 (第 17 期), 6894-6900.

D. V. Bavykin et al.. A novel cation-binding TiO₂ nanotube substrate for electro- and bioelectro-catalysis. 《Electrochemistry Communications》. 2005, 第 7 卷 1050-1058.

D. V. Bavykin et al.. A novel cation-binding TiO₂ nanotube substrate for electro- and bioelectro-catalysis. 《Electrochemistry Communications》. 2005, 第 7 卷 1050-1058.

Wenjun Dong et al.. Biocompatible nanofiber scaffolds on metal for controlled release and cell colonization. 《Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine》. 2006, 第 2 卷 248-252.

Wenjun Dong et al.. Biocompatible

(续)

审查员 黄长斌

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 6 页

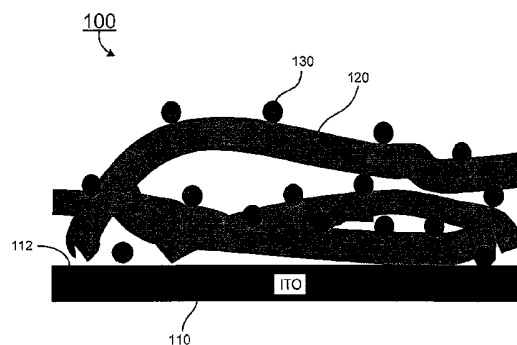
(54) 发明名称

用于自动检测蛋白质的生物兼容支架材料

(57) 摘要

本发明涉及一种可电化学检测化学制品和生物分子氧化还原活性的生物兼容支架材料。在一个实施例中,所述生物兼容支架材料,包括基体、在所述基体上形成的含 TiO₂ 的纳米丝或纳米纤维导电层,其中所述含 TiO₂ 的纳米丝或纳米纤维导电层是以孔结构形成的,且当所述生物兼容支架材料与生物分析物接触时,所述生物分析物的一种或多种蛋白将固定在所述含 TiO₂ 的纳米丝或纳米纤维导电层的表面上,进而生成可测量的感应

电流信号。



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

nanofiber scaffolds on metal for
controlled release and cell colonization.

《Nanomedicine:Nanotechnology, Biology, and
Medicine》.2006, 第 2 卷 248-252.

1. 一种生物兼容支架材料,包括:
 - a. 基体;以及
 - b. 在所述基体上形成的含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维导电层,其特征在于,所述含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维导电层是以孔结构形成的,且当所述生物兼容支架材料与生物分析物接触时,所述生物分析物的一种或多种蛋白将固定在所述含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维导电层的表面上,进而生成可测量的感应电流信号,所述孔结构的厚度范围为 $1\text{--}50\text{ }\mu\text{m}$,所述孔结构包括分层钛酸盐结构 $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$,其夹层间具有对冲阳离子 Na^+ ,所述基体由氧化铟锡构成。
2. 根据权利要求 1 所述的生物兼容支架材料,其特征在于,所述蛋白包括氧化还原活性血红蛋白。
3. 根据权利要求 2 所述的生物兼容支架材料,其特征在于,所述氧化还原活性血红蛋白包括细胞色素 c。
4. 根据权利要求 1 所述的生物兼容支架材料,其特征在于,所述含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维主要是 $\text{TiO}_2\text{-B}$ 相或钛酸盐相。
5. 根据权利要求 4 所述的生物兼容支架材料,其特征在于,所述含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维具有的典型直径范围为 $20\text{--}150\text{nm}$ 。
6. 用于检测生物分析物中一种或多种蛋白的生物传感器 (100),包括
 - a. 具有表层 (112) 的基体 (110);
 - b. 在所述基体 (110) 的表层 (112) 上形成的纳米丝或纳米纤维层 (120),在此形成的所述纳米丝或纳米纤维层具有孔结构,所述孔结构的厚度范围为 $1\text{--}50\text{ }\mu\text{m}$,所述孔结构包括分层钛酸盐结构 $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$,其夹层间具有对冲阳离子 Na^+ ,所述基体由氧化铟锡构成;以及
 - c. 与所述基体 (110) 通信的检测器 (140),当纳米丝或纳米纤维构成的层 (120) 与生物分析物的一种或多种蛋白接触时,将生成可测量信号并可由所述检测器 (140) 检测。
7. 根据权利要求 6 所述的生物传感器,其特征在于,所述一种或多种蛋白包括氧化还原活性血红蛋白。
8. 根据权利要求 7 所述的生物传感器,其特征在于,所述氧化还原活性血红蛋白包括细胞色素 c。
9. 根据权利要求 8 所述的生物传感器,其特征在于,所述生物分析物包括 pH 范围为 $6.2\text{--}9.0$ 的缓冲溶液,这样细胞色素 c 和纳米丝或纳米纤维分别携带净正电荷和净负电荷。
10. 根据权利要求 6 所述的生物传感器,其特征在于,所述纳米丝或纳米纤维的典型直径范围为 $20\text{--}150\text{nm}$ 。
11. 根据权利要求 6 所述的生物传感器,其特征在于,所述生物传感器进一步包括用于以 $0.005\text{--}0.500\text{V/s}$ 的扫描速率范围将电压施加到生物分析物的器件。
12. 根据权利要求 11 所述的生物传感器,其特征在于,所述检测器包括循环伏安扫描仪。
13. 根据权利要求 12 所述的生物传感器,其特征在于,当纳米丝或纳米纤维形成的层 (120) 与生物分析物中的一种或多种蛋白接触时,生物分析物和基体之间的一种或多种电子转移将产生感应电流形式的可测量信号。
14. 一种用于检测生物分析物中一种或多种蛋白的方法,其特征在于,所述方法包括下

列步骤：

a. 提供生物传感器,所述生物传感器具有电极和支架材料,所述支架材料具有基体和
在所述基体的表面形成的纳米丝或纳米纤维层,在此形成的所述纳米丝或纳米纤维层具有
孔结构,所述孔结构的厚度范围为 1-50 μm ,所述孔结构包括分层钛酸盐结构 $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$,其夹
层间具有对冲阳离子 Na^+ ,所述基体由氧化铟锡构成;

b. 将所述生物分析物导入到所述支架材料中;以及

c. 检测所述生物分析物和所述基体表面之间的电子转移,进而检测生物分析物中的一
种或多种蛋白。

15. 根据权利要求 14 所述方法,其特征在于,所述生物分析物包括氧化还原活性血红
素蛋白。

16. 根据权利要求 15 所述方法,其特征在于,所述氧化还原活性血红素蛋白包括细胞
色素 c。

17. 根据权利要求 16 所述方法,其特征在于,所述生物分析物包括 pH 范围为 6.2-9.0
的缓冲溶液,这样细胞色素 c 和纳米丝或纳米纤维分别携带净正电荷和净负电荷。

18. 根据权利要求 14 所述方法,其特征在于,进一步包括以 0.005-0.500V/s 的扫描速
率范围将电压施加到生物分析物的步骤。

19. 根据权利要求 18 所述方法,其特征在于,所述测量步骤由循环伏安法完成。

用于自动检测蛋白质的生物兼容支架材料

[0001] 本申请是以阿肯色州大学技术发展基金会（美国国有公司）的名义作为 PCT 国际申请提交的，申请除美国外所有国家，并且以 Z. Ryan Tian（美国公民）的名义在 2007 年 1 月 12 日仅申请美国专利。

[0002] 相关专利申请的交叉引用

[0003] 本申请受益于申请人 Z. Ryan Tian 在 2007 年 1 月 12 日提出的，申请号为 11/653,189（第 189 号申请），名为“TiO₂ 纳米结构、膜和薄层及其制备方法”的专利申请，而该专利申请自身按照美国专利法 35U. S. C. § 119(e)，要求申请人 Z. Ryan Tian 和 Wenjun Dong 在 2006 年 1 月 12 日提出的，美国临时专利申请号为 60/758,492，名为“TiO₂ 纳米纤维膜、及其制造方法和应用”，和申请人 Z. Ryan Tian 和 Wenjun Dong 在 2006 年 3 月 23 日提出的，申请号为 60/785,649，名为“TiO₂ 纳米纤维、膜和薄层、及其制造方法和应用”的专利申请，在此结合引用，以作参考。

[0004] 本申请还受益于申请人 Z. Ryan Tian 在 2007 年 1 月 12 日提出的，申请号为 11/653,192，名为“TiO₂ 纳米结构、膜和薄层及其应用”的专利申请，而该专利申请自身按照美国专利法 35U. S. C. § 119(e)，要求申请人 Z. Ryan Tian 和 Wenjun Dong 在 2006 年 1 月 12 日提出的，美国临时专利申请号为 60/758,492，名为“TiO₂ 纳米纤维膜、及其制造方法和应用”，和申请人 Z. Ryan Tian 和 Wenjun Dong 在 2006 年 3 月 23 日提出的，申请号为 60/785,649，名为“TiO₂ 纳米纤维、膜和薄层、及其制造方法和应用”的专利申请，并且该申请同样涉及未决的 189 号申请，在此结合引用，以作参考。

[0005] 本发明的说明书中引用和讨论了一些参考文献，包括专利、专利申请和各类出版物。对这些参考文献的引用和讨论仅仅是用于清楚地说明本发明的说明书，并不是承认这些参考文献是本发明的所指的“现有技术”。在说明书中所有引用和讨论的文献在此以同样的程度集合引用，就像这些文献单独结合参考一样。在下文中以 [n] 的形式显示其为参考文献列表中第 n 篇引用的对比文献。例如，[15] 在文献列表中为第 15 篇引用的参考文献，也就是，Dong, W. ;Cogbill, A. ;Zhang, T. ;Ghosh, S. ;Tian, R. Z. J. Phys. Chem. 2006, 16819。

技术领域

[0006] 本发明一般涉及生物传感器，更具体地说，涉及一种生物兼容纳米丝（nanowire）支架材料，该支架材料适用于检测生物分析物中的一种或多种蛋白并可用于支撑细胞生长。

背景技术

[0007] 在生物支架材料的微米大小的孔中，某些蛋白（像生长激素 GH）的活性对于组织再生来说是至关重要的 [1]，这些组织包括神经细胞组织 [2] 和骨组织 [3,4]。然而，监测和检测生物支架材料内的蛋白活性仍然面临挑战。要发展一种可以接受该挑战的简单经济的电化学蛋白传感器，蛋白和固体电极表面之间快速的电子转移是必要条件。然而，基于多肽 - 和 / 或聚合物的生物支架材料通常电导率较低。

[0008] 氧化还原蛋白,如血红素蛋白,自带有电化学活性,并因此能够直接与工作电极交换电子以产生电化学信号。这使得无需介导方法(如通过酶介导反应)就可直接电化学检测和定量。

[0009] 通常,需要依靠实验室分析技术来定量氧化还原蛋白,如通过连接到包括在不同电位的一系列多孔电极的检测器上的高性能液体色谱。虽然该系统是非常精确的,但是实验所需的空间和费用使得其不适合大规模的样本检测或国内消费者使用。此外,生物样品一般必须经过昂贵的预处理使其成为可以被 HPLC 分析的形式。

[0010] 这样,用于定量氧化还原蛋白的生物传感器件虽然不够精确,发展一种便于携带、一次性的并且能够分析最简预处理后的生物样品的生物传感器件,从而在多路实时且无需实验室检测蛋白的方面对现有技术进行改进,引起了人们的极大兴趣。

[0011] 因此,直到现在,上述缺陷和不足在本领域中仍然存在,并且需要解决。

发明内容

[0012] 在一个方面,本发明涉及一种生物兼容支架材料。

[0013] 在一个实施例中,所述生物兼容支架材料包括基体、在所述基体上形成的含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维导电层,在此所述含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维导电层是以孔结构形成的,且当所述生物兼容支架材料与生物分析物接触时,所述生物分析物的一种或多种蛋白将固定在所述含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维导电层的表面上,进而生成可测量的感应电流信号。

[0014] 所述含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维主要是 TiO_2 -B 相或钛酸盐相的,并且具有的典型直径范围约为 20-150nm。

[0015] 在一个实施例中,所述孔结构的厚度范围约为 1-50 μm 。所述纳米丝或纳米纤维结构可具有分层钛酸盐 ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$) 结构,该结构在其夹层间具有对冲阳离子(counter-cations) (Na^+)。该基体由氧化铟锡(ITO) 或金属构成。

[0016] 在一个实施例中,所述蛋白包括具有氧化还原活性中心的蛋白。所述氧化还原活性血红素蛋白包括细胞色素 c。

[0017] 所述基体可以是导体或是半导体。在一个实施例中,所述基体由氧化铟锡(ITO) 构成。

[0018] 在另一方面中,本发明涉及生物兼容支架材料。在一个实施例中,该生物兼容支架材料具有基体,以及在该基体上形成的纳米丝或纳米纤维层。

[0019] 形成的纳米丝或纳米纤维层具有孔结构。该纳米丝或纳米纤维包括含氧化物的纳米丝或纳米纤维。在一个具体实施例中,所述纳米丝或纳米纤维包括含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维。

[0020] 在另一方面中,本发明涉及一直用于检测生物分析物中一种或多种蛋白的生物传感器。在一个实施例中,该生物传感器包括具有表面的基体,在所述基体的表面上形成的纳米丝或纳米纤维层,在此形成的该纳米丝或纳米纤维层具有孔结构,所述生物传感器还包括与该基体通信的检测器,在此当纳米丝或纳米纤维的层与生物分析物的一种或多种蛋白接触时,将生成可测量信号并可由该检测器检测。

[0021] 该生物传感器进一步包括用于以约 0.005-0.500V/s 的扫描速率范围将电压

施加到生物分析物的器件。在一个实施例中,所述检测器包括循环伏安扫描仪(cyclic voltammetry)。当纳米丝或纳米纤维形成的层与生物分析物中的一种或多种蛋白接触时,生物分析物和基体之间的一种或多种电子转移将产生感应电流形式的可测量信号。

[0022] 在一个实施例中,所述生物分析物中的一种或多种蛋白包含氧化还原活性血红蛋白蛋白。所述氧化还原活性血红蛋白蛋白包括细胞色素 c。该生物分析物包括 pH 范围约为 6.2-9.0 的缓冲溶液,这样细胞色素 c 和纳米丝或纳米纤维分别携带净正电荷和净负电荷。

[0023] 所述纳米丝或纳米纤维是含氧化物的纳米丝或纳米纤维。在一个实施例中,该纳米丝或纳米纤维是含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维。在此,该含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维主要是 TiO_2 -B 相或钛酸盐相。在一个实施例中,所述纳米丝或纳米管的典型直径范围约为 20-150nm。

[0024] 在一个实施例中,所述基体由氧化铟锡(ITO)构成。所述基体可以是导体或半导体。

[0025] 在另一方面中,本发明涉及用于检测生物分析物中一种或多种蛋白的方法。在一个实施例中,所述方法包括提供具有至少一个电极和由纳米丝或纳米纤维构成的支架材料的生物传感器的步骤,将所述生物分析物导入到所述支架材料中的步骤,以及检测生物分析物和所述支架材料的表面之间的电子转移,以检测生物分析物中一种或多种蛋白的步骤。在一个实施例中,所述检测步骤由 CV 来完成。

[0026] 所述方法进一步包括以约 0.005-0.500V/s 的扫描速率范围将电压施加到生物分析物的步骤。

[0027] 在一个实施例中,所述生物分析物包含氧化还原活性血红蛋白蛋白。所述氧化还原活性血红蛋白蛋白包括细胞色素 c。

[0028] 该生物分析物包括 pH 范围约为 6.2-9.0 的缓冲溶液,这样细胞色素 c 和纳米丝或纳米纤维分别携带净正电荷和净负电荷。

[0029] 通过以下的描述、具体实施例,再结合附图,可以更深入地理解本发明的各个方面。可对这些特征和实施例进行各种改变或等效替换而不超出本发明的保护范围。

附图说明

[0030] 附图例示了本发明的一个或多个实施例,并与相关描述一起说明了本发明的原理。在任何可能的情况下,附图中同一个附图标记在各幅附图中用于表示一个实施例中相同的部件或功能相似的部件,其中:

[0031] 图 1 示意性地示出了根据本发明的实施例的生物传感器;

[0032] 图 2 分别示出了根据本发明的实施例在约 180°C 的温度条件下耗时约三天合成的钛酸盐纳米丝(NW)支架材料的表征图,(a)钛酸盐 NW 支架材料的 SEM 图,(b)钛酸盐 NW 支架材料的 TEM 图,(c)钛酸盐 NW 支架材料的 XRD 图,在此,该钛酸盐相为 $2\theta = 9.8^\circ$ (001), 11.2° (200), 24.4° (110) 和 29.7° (003) (JCPDScard No. :47-0561),以及 (d)FT-IR 光谱,在此,曲线 210 是固定到钛酸盐 -NW 支架材料上的细胞色素 c 的 FT-IR 光谱,其中所述细胞色素 c 混合了 KBr,且曲线 220 是 pH 6.8 的缓冲溶液中的细胞色素 c 的 FT-IR 光谱;

[0033] 图 3 示出了图 2 中示出的钛酸盐 NW 支架材料的表征(阳极电流, i_{pa} ,以及阴极电流 i_{pc}), (a)覆盖钛酸盐 NW 的 ITO 玻璃电极在 pH6.8 的缓冲溶液中的 CV 曲线(曲线 330a

用于 i_{pa} , 曲线 330c 用于 i_{pc}) 以及在钛酸盐 NW 上固定有 450 皮摩的细胞色素 c 的 ITO 玻璃电极在 pH6.8 的缓冲溶液中的 CV 曲线 (曲线 340a 用于 i_{pa} , 曲线 340c 用于 i_{pc}), 在此扫描速率约为 0.2V/s; (b) 各种浓度的细胞色素 c 在 pH6.8 的缓冲溶液中的 CV 曲线, 其中曲线 351a 是 45 皮摩的 i_{pa} , 曲线 352a 是 122 皮摩的 i_{pa} , 曲线 353a 是 243 皮摩的 i_{pa} , 曲线 354a 是 347 皮摩的 i_{pa} , 曲线 355a 是 450 皮摩的 i_{pa} , 且在此扫描速率约为 0.2V/s; (c) 细胞色素 c 浓度和阳极电流 i_{pa} 的线性关系; 以及 (d) 在钛酸盐 NW 支架材料上培养 72 小时后, 在钛酸盐 NW 支架材料上生长的 PC-12 细胞的 SEM 图;

[0034] 图 4 示出了图 2 中示出的钛酸盐 NW 支架材料的表征, (a) 在钛酸盐 NW 支架材料上培养 72 小时后, 在钛酸盐 NW 支架材料上生长的 PC-12 细胞的 SEM 图; 以及 (b) 固定在钛酸盐 NW 支架材料上的细胞色素 c 在不同的电位扫描速率和 pH 值的 CV 曲线;

[0035] 图 5 示出了根据本发明的一个实施例的 NW 支架材料的表征;

[0036] 图 6 示出了根据本发明的一个实施例的 NW 支架材料的表征。

具体实施方式

[0037] 在本发明的上下文中, 在本发明中使用这些术语的特定上下文中, 本说明书中使用的术语具有其在本领域中的通用含义。

[0038] 以下或是在本说明书的其它位置, 对某些用于描述本发明的术语进行了讨论, 以便在对本发明的装置和方法的描述中, 以及对这些装置和方法的制造和使用中向技术人员提供附加的指导。为了便于阅读, 对某些术语进行了标记, 比如采用斜体和 / 或引号。这些标记的使用并不影响该术语的范围和意义, 该术语的范围和意义是相同的, 在同一部分中, 无论该术语是否被标记, 其含义是一样的。应了解, 同一事件可以有多种说法。因此, 可将替换用语和同义词用于此处所讨论的任意一个或多个术语, 无论一个术语是制备的还是此处讨论过的, 其并不具备任何特殊的含义。还提供了某些术语的同义词。一个或多个同义词的叙述并不排除其它同义词的使用。在本发明中使用的实施例 (包括任何此处讨论的术语的例子), 仅仅是用于示例性的, 并不用于限制本发明的范围和含义或是任何例举出的术语。同样的, 本发明并不限于说明书中给出的实施例。此外, 小标题可用于帮助说明书的读者通读整个说明书, 然而小标题的使用并不影响本发明的范围。

[0039] 如此处使用的, “大约”或“近似”一般指给定值或范围的 20 个百分点内, 优选 10 个百分点内, 最佳是位于 5 个百分点以内。此处给出的数量是近似的, 意味着如果没有清楚地表述, 术语“大约”或“近似”可以进行推导。

[0040] 如此处使用的, 术语“等电位点”或其缩写“pI”是指分子或表面不携带净电荷的 pH。为了具有更灵敏的 pI, 分子 (或表面) 必须是两性的, 意指其必须具有酸性和碱性基团。蛋白和氨基酸是符合这一要求的常见分子。

[0041] 蛋白可通过已知的等电聚焦过程根据其等电位点进行分离。在低于 pI 的 pH, 蛋白可携带净正电荷。高于 pI, 其可携带净负电荷。这意味着可跑电泳凝胶。电泳凝胶的 pH 可由该凝胶使用的缓冲溶液来确定。如果该缓冲溶液的 pH 高于蛋白的 pI, 该蛋白将移动到正极 (负电荷将吸引到正极)。如果该缓冲溶液的 pH 低于蛋白的 pI, 该蛋白将移动到负极 (正电荷将吸引到负极)。如果蛋白是在 pH 值等于其 pI 的缓冲溶液中跑电泳的, 其将不会移动。

[0042] 如此处使用的,术语“循环伏安法”或其缩写“CV”是指一种类型的动电位电化学测量法。为了获得循环伏安,可测量溶液中的电压变化和电流随着电压变化而产生的变化。这是研究化学和界面结构的氧化还原性质的伏安法中的一种特定类型。

[0043] 在循环伏安实验中,将电位施加到系统中,且测量感应电流响应(感应电流是氧化还原反应产生的电流)。可测量一定电位范围内的该电流响应(电位窗口),该电压范围起于一个起始值,并以线性方式变化到一个预定限值。在这一电位(通常称为切换电位(switching potential)),电位扫描的方向反转,且同时反向扫描同一电位窗口。这意指,例如在第一次(正向)扫描氧化形成的元素将在第二次(反向)扫描时被还原。这一技术常常使用,因为其提供了用于初始表征氧化还原活性系统的快速且简单的方法。其除了还可提供氧化还原电位估计外,还可提供电极和分析物之间电子转移的速率信息,以及分析物在电解氧化状态的稳定性(例如,如果其经历任何化学反应)。

[0044] 本发明的整体观点

[0045] 生物兼容支架材料对组织再生是很重要的[1],如骨组织[3,4]在蛋白如生长激素的诱导下再生。为了检测生物兼容支架材料中蛋白的活性,需要发展一种电化学蛋白传感器,其具有能够在蛋白和传感器电极之间实现快速电子转移的支架。然而,基于多肽-和/或聚合物的生物支架材料通常电导率较低。

[0046] 固体纳米丝(NW)被认为是可用于检测单个病毒[5]。其中,基于 TiO_2 的NW制作成本低、生物相容性高、化学和光化学性能稳定,且蛋白变性小,因此被广泛应用[6-8]。例如,血红素蛋白可以被固定到 TiO_2 纳米颗粒和纳米管上(NT)[9-14]。

[0047] 除此之外,本发明还公开了钛酸盐-NW生物兼容支架材料,其在氧化铟锡(ITO)基体(电极)的表面上彼此缠绕。钛酸盐-支架材料用作生物传感器,或至少是生物传感器的一部分,用于检测预固定在钛酸盐-NW表面的细胞色素c(cyt c)的电化学氧化还原电位。另外,钛酸盐-NW支架材料可用于支持嗜铬细胞瘤细胞(PC-12)的生长。

[0048] 将结合本发明的实施例和附图1-6进行描述。根据本发明的目的,如在此的具体和概括描述,在本发明的一个方面,涉及用于自动检测生物分析物中的蛋白以及支持和引导干细胞生长的生物兼容支架材料。

[0049] 所述生物兼容支架材料包括基体、在所述基体上形成的含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维导电层。该基体可以是导体或半导体。在一个实施例中,所述基体由氧化铟锡(ITO)构成。在此所述含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维导电层是以孔结构形成的,该孔结构的厚度范围为1-50 μm 。该孔结构可具有分层钛酸盐($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$)结构,该结构在其夹层间具有对冲阳离子(counter-cations)(Na^+)。所述含 TiO_2 的NW主要是 TiO_2 -B相或钛酸盐相的,并且具有的典型直径范围约为20-150nm。

[0050] 其它含层间阳离子的NW也可用于实现本发明。

[0051] 当所述生物兼容支架材料与生物分析物接触时,所述生物分析物的一种或多种蛋白将固定在所述含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维导电层的表面上,在此可在生物分析物和含 TiO_2 的纳米丝或纳米纤维导电层表面之间将出现电子转移。该电子转移将生成可测量的感应电流信号。

[0052] 该生物兼容支架材料可用于检测生物分析物中的氧化还原活性血红素蛋白。细胞色素c(cyt c)是氧化还原活性的血红素蛋白,其具有104个氨基酸,且作为电子传送链中

的电子载体位于线粒体的内膜空间。其为可溶性蛋白,且能够经受氧化和还原,但不能结合氧原子。在 pH 范围约为 6.2-9.0 的缓冲溶液中,细胞色素 c 携带净正电荷,而纳米丝或纳米纤维携带净负电荷。当细胞色素 c 固定在含 TiO_2 的 NW 支架材料的表面时,细胞色素 c 和 NW 支架材料之间的一种或多种电子转移将以感应电流的形式产生可测量信号。这可由循环伏安法 (CV) 检测。也可采用其它的蛋白来实现本发明。

[0053] 参照图 1,示出了根据本发明的一个实施例的生物传感器 100,该生物传感器 100 使用 NW 支架材料 120 来检测生物分析物中的一种或多种蛋白。

[0054] 生物传感器 100 具有基体 100,该基体 100 具有表面 112,由 NW 在基体 100 的表面 112 上形成的支架材料 120,以及与所述基体 110 通信的检测器未示出(未示出)。在运行中,NW 支架材料 120 与含氧化还原活性血红素蛋白 130 和缓冲溶液的生物分析物接触。该缓冲溶液的 pH 范围约为 6.2-9.0。该氧化还原活性血红素蛋白,如 cyt c 130,固定在 NW 120 的表面。cyt c 在 NW 支架材料上的结合主要归咎于负电荷 NW 表面和正电荷 cyt c 表面之间的静电交互。在 pH6.2-9.0,由于其等电位点为 6.2, NW 表面是负电荷 [21],然而由于其等电位点为 10.0-10.5, cyt c 表面是正电荷。这样,负 NW 表面示出对正 cyt c 的高吸引力。此外, cyt c 在水中的形状是近似球形的 ($a*b*c = 1.5\text{nm}*1.7\text{nm}*1.7\text{nm}$) [22]),这样, cyt c 可易于固定在 NW 支架材料的空处(直径 > 500nm) 以在电化学氧化还原过程中进一步增强 cyt c 的停留。

[0055] 另外生物传感器 100 还可包括用于以约 0.005-0.500V/s 的扫描速率将电位施加到生物分析物中的器件(未示出)。与基体 110 通信的检测器可用于检测生物分析物和基体 110 的表面 112 之间的电子转移。该检测器包括 CV。该电子转移可以感应电流 i_p 的形式测得。生物分析物中是否有蛋白和 / 或其量可以由感应电流 i_p 确定。

[0056] NW 支架材料可用于支持细胞,如嗜铬细胞瘤细胞 (PC-12) 的生长。在一个实施例中。该 NW 支架材料至少部分覆盖了大量生物分子,包括生长激素。

[0057] 本发明的另一方面涉及用于检测生物分析物中一种或多种蛋白的方法。在一个实施例中,所述方法包括下列步骤,首先提供生物传感器,该生物传感器具有电极和在该电极上由 NW 形成的支架材料。接着将所述生物分析物导入到所述支架材料中。接着采用 CV 检测生物分析物和所述基体表面之间的电子转移,该 CV 用来检测生物分析物中是否有蛋白和 / 或其量。

[0058] 下面对本发明的这些和其它方面做进一步地说明。

[0059] 本发明的实现和实施例

[0060] 下面示出了根据本发明的实施例的典型方法和其相关结果,这些实施例并不是用于限制本发明的范围。应注意,在实施例中用到的标题或小标题都是为了方便读者,并不是以任何方式限制发明的范围。此外,自此提到并公开了一些理论,然而无论这些理论正确与否,都不是以任何方式限制本发明的范围,这样可完全根据本发明的描述实施本发明而无需考虑任何特定的理论或动作安排。

[0061] 实施例:用于直接自动检测蛋白的生物兼容支架材料

[0062] 在该典型实施例中,钛酸盐-NW 缠绕在 ITO 基体的表面形成支架材料,其可用于监测预固定在钛酸盐-NW 表面的细胞色素 c 的电化学氧化还原电位。该钛酸盐-NW 在约 240°C 的温度条件下耗时约三天合成。

[0063] 图 2a 和 2b 分别示出了钛酸盐 -NW 支架的扫描电镜图 (SEM) 和透射电子显微镜图 (TEM)。图 2c 中示出了钛酸盐 -NW 支架的粉末 X 射线衍射图。该 X 射线衍射清楚显示了 NW 的晶体结构属于钛酸盐相 (也就是, $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$), 其由下列晶格参数表征: $[2\theta = 9.8^\circ (001), 11.2^\circ (200), 24.4^\circ (110) \text{ 和 } 29.7^\circ (003) (\text{JCPDScard No. :47-0561})]$ 。该边缘共享 (edge-shared) 的 TiO_6 - 八面体是形成该负电荷分层钛酸盐结构的基本单元 [15], 该分层钛酸盐结构具有位于内层空间中的钠对冲阳离子 (Na^+), 这样将导致根据阳离子的大小和水合度形成可变的层间距。因此, 该钛酸盐 NW 支架材料具有孔结构, 如图 2a 和 2b 所示。在采用去离子蒸馏水 (DDW 接近 pH 接近 7) 洗涤以后, 该钠对冲阳离子可由质子取代。

[0064] 通常, 风干的 NW- 支架材料的阻抗高于 $10^6\Omega\text{m}$, 这并不适用于电化学自动检测。然而, NW 表面上的羟基 ($-\text{OH}$) [4] 在 pH6.2-9 的缓冲溶液中将在水 -NW 界面 [16] 处产生湿电子的效果, 以在 NW 表面上形成用于快速 ET 的低 - 能量路径, 这将确保信号转换能够在生物传感中跨越整个生物兼容的支架材料进行。换句话说, 在缓冲溶液中, 钛酸盐 NW 的表面可以是负电荷的并形成 $\text{Ti}-\text{OH}$ [4]。水和氧化金属之间的界面可生成湿电子 [16], 因此钛酸盐 NW 的导电性得到改进。

[0065] 细胞色素 c 是氧化还原 - 活性血红素蛋白, 具有 104 个氨基酸, 且作为电子传送链中的电子载体位于线粒体的内膜空间。为了检验在结合到负电荷表面以后, cyt c 在是否不再稳固 [17-19], 可使用傅立叶转换红外光谱 (FT-IR) 以表征蛋白中对多肽构造敏感的氨基基团。通常, 由于沿着蛋白主链的 $\text{C}=\text{O}$ 基团的伸缩振动, 所述氨基 I 信号主要在 $1600-1700\text{cm}^{-1}$ 。图 2d 示出了 FT-IR 光谱, 其中曲线 210 是混合 KBr 的细胞色素 c- 钛酸盐 NW 的 FT-IR 光谱, 曲线 220 是在 pH6.8 缓冲溶液中的细胞色素 c 的 FT-IR 光谱。该 FT-IR 光谱示出在 NW 上固定的 cyt c 的氨基 I 的峰值为 1648cm^{-1} , 这与从 pH6.8 的缓冲溶液中天然 cyt c 获得的一样 [20], 示出了固定到钛酸盐 -NW 支架材料上的 cyt c 的残留二级结构 (retained secondary structure)。

[0066] 钛酸盐 NW 支架材料上结合的 cyt c 主要归咎于负电荷 NW 表面和正电荷 cyt c 表面之间的静电交互。在 pH6.2-9.0, 由于其等电位点为 6.2, NW 表面是负电荷 [21], 然而由于其等电位点为 10.0-10.5, cyt c 表面是正电荷。这样, 负 NW 表面示出对正 cyt c 的高吸引力。此外, cyt c 在水中的形状是近似球形的 ($a*b*c = 1.5\text{nm}*1.7\text{nm}*1.7\text{nm}$) [22]), 这样, cyt c 可易于固定在支架材料的空处 (直径 $> 500\text{nm}$) 以在电化学氧化还原过程中进一步增强 cyt c 的停留。

[0067] NW 支架材料为 cyt c 提供了理想的环境以进行敏捷的电子转移反应。在该典型实施例中, 可通过 CV 在不同的浓度下研究固定有细胞色素 c 的 NW 的表面电化学特性, 其指示出 cyt c 的 45 皮摩 (或 10^{-12} 摩尔) 的检测限制。

[0068] 图 3a 分别示出了从覆盖有 NW (信号 330a 用于阳极电流 i_{pa} , 且信号 330c 用于阴极电流 i_{pc}) 和 cyt c-NW 的 ITO 玻璃电极在 $\text{pH} = 6.8$ 的磷酸钾缓冲溶液中的 CV 信号 (信号 340a 用于阳极电流 i_{pa} , 且信号 340c 用于阴极电流 i_{pc})。扫描速率约为 0.2V/s 。已经通过 cyt c-NW 电极记录到了一对具有表观峰值电位 (E^0) 的可逆并且清晰的氧化还原峰。该 E^0 值 (0.03V), 从阳极峰电位值和阴极峰电位值计算的均值, 与 Stellwagen [23] 的报道接近。基于其结构和形态, NW 表现为导电“纳米缆” [16] 以便于电子转移。

[0069] 作为扫描速率的感应电流的测量可用于诊断电极表面是否有由扩散控制的氧化

还原反应。该阳极和阴极峰值均与从 0.01V/s 到 0.2V/s 的扫描速率线性相关,这意味着这样一个电极具有典型的薄层电化学特征 [24]。 i_{pc} 和 i_{pa} 的比例约为 2.0,且氧化还原峰值的间隔约为 58mV(数据未示出),这意味着 cytc-NW 电极表面上的电化学反应可以是准可逆的 [24]。

[0070] 如图 3b 所示,在 pH6.8 的缓冲溶液中,该感应电流随着支架材料中的 cytc 的浓度线性增加,在此信号 351a 是 45 皮摩的 i_{pa} ,信号 352a 是 122 皮摩的 i_{pa} ,信号 353a 是 243 皮摩的 i_{pa} ,信号 354a 是 243 皮摩的 i_{pa} ,信号 355a 是 347 皮摩的 i_{pa} ,且在此扫描速率约为 0.2V/s。该可逆的且清晰的 CV 信号可以在 3.0 μ M 和 30.0 的 μ M 之间,或 45 到 450 皮摩之间的 15 μ L 的溶液中观察到。这些浓度可以与阳极电流完全线性相关 ($R = 0.9887$) 的,如图 3c 所示。

[0071] 其结果显示这样一种钛酸盐 NW 修饰的 ITO 电极可以用作多元自动检测平台,用于发展稳健的、灵敏的、经济的纳米生物传感器。

[0072] 另外,该 NW 支架材料也可用于支持和引导嗜铬细胞瘤细胞 (PC-12) 的生长,在此有利于细胞活性。图 3d 和 4a 是在 NW 支架材料上培养约 72 小时的 PC-12 细胞的 SEM 图,示出了 PC-12 细胞良好地附着在 NW 支架材料上并且在该材料上形成细胞群。这些细胞在外形上表现为圆形,并维持其形态,这意味着细胞和 NW 支架材料之间有良好的兼容性。附着在钛酸盐 NW 支架材料上的 PC-12 细胞进一步意味着吸附的蛋白并没有丧失任何活性。

[0073] 图 4b 示出了固定在 NW 支架材料薄膜上的蛋白细胞色素 c 在不同电位扫描速率和 pH 值的 CV 信号。在 6.8-9.0 的 pH 范围内,可获得 45 皮摩的细胞色素 c 的可重复检测下限,这显示了在钛酸盐 NW 修饰的 ITO 电极上的细胞色素 c 的直接电子转移被大大增强。NW 上的细胞色素 c 的均匀电位取决于 pH 变化。其结果为在陶瓷纳米丝表面上功能化制作基于 NW 吸引力-特定生物纳米传感器提供了新的见解,并可产生用于发展稳健的、灵敏的、经济的纳米生物传感器的多元自动检测平台。

[0074] 图 5 和 6 是根据本发明的其它实施例的 NW 支架材料的 CV 信号。

[0075] 简而言之,本发明,除其它外,公开了一种生物兼容的钛酸盐 NW 支架材料,以及一种基于钛酸盐 NW 支架材料的生物传感器。该钛酸盐 NW 支架材料增强了 ITO 电极和 cyt c 之间的电子转移。该基于钛酸盐 NW 支架材料的生物传感器可应用于在基于钛酸盐 NW 支架材料的受限环境中实时对固定的氧化还原活性蛋白进行直接检测,以及监测在干细胞的生长过程中的生物化学过程。

[0076] 上述对本发明的优选实施例的描述的目的是为了举例说明及描述。这些实施例不是穷尽性的,也就是说本发明不受所公开的精确形式的限制,在本发明的教导下或从本发明的实践中可以获得对这些实施例的多种修改和变化。

[0077] 对实施例的选择和描述是为了对本发明的原理及其实际应用做出解释,以使本领域的技术人员能够在各种实施例中利用本发明、以及为配合特殊用途进行各种修改。本领域技术人员清楚在不脱离本发明的原理和范围内的替换实施例。因此,本发明的范围由本发明的权利要求及其等同限定的,而不是前面的描述和此处描述的典型实施例。

[0078] 参考文献

[0079] . Murugan, R. ;Ramakrishna, S. Tissue Eng. 2006,12,435.

[0080] . Ellis-Behnke, R. G. ;Liang, Y. ;You, S. ;Tay, D. K. ;Zhang, S. ;So, K. F. ;

- Schneider, G. E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103, 5054.
- [0081] . Liao, S. ;Cui, F. ;Zhang, W. ;Feng, Q. J. Biomed. Mater. Res. 2004, 69B(2), 158.
- [0082] . Kokubo, T. ;Kim, H. M. ;Kawashita, M. Biomaterials 2003, 24, 2161.
- [0083] . Patolsky, F. ;Zheng, G. ;Hayden, O. ;Lakadamyali, M. ;Zhuang, X. ;Liber, C. M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 14017.
- [0084] . O' Regan, B. ; **Grätzel**, M. Nature 1991, 353, 737.
- [0085] . Cosnier, S. ;Gondran, C. ;Senillou, A. ; **Grätzel**, M. ;Vlachopoulos, N. Electroanalysis. 1997, 9, 1387.
- [0086] . Leng, Y. ;Huang, N. ;Yang, P. ;Chen, J. ;Sun, H. ;Wang, J. ;Wan, G. . ;Tian, X. ;Fu, R. K. Y. ;Wang, L. ;Chu, P. K. Surf. Coat. Technol. 2002, 156(1-3), 295.
- [0087] . McKenzie, K. J. ;Marken, F. Langmuir 2003, 19, 4327.
- [0088] . Topoglidis, E. ;Cass, A. E. G. ;O' Regan, B. ;Durrant, J. R. J. electroanal. Chem. 2001, 517, 20.
- [0089] . Topoglidis, E. ;Campbell, C. J. ;Cass, A. E. G. ;Durrant, J. R. Langmuir 2001, 17, 7899.
- [0090] . Paddon, C. A. ;Marken, F. Eletrochem. Commun. 2004, 6, 1249.
- [0091] . Zhou, H. ;Gan, X. ;Wang, J. ;Zhu, X. ;Li, G. Anal. Chem. 2005, 77, 6102.
- [0092] . Liu, A. ;Wei, M. ;Honma, I ;Zhou, H. Anal. Chem. 2005, 77, 8068.
- [0093] . Dong, W. ;Cogbill, A. ;Zhang, T. ;Ghosh, S. ;Tian, R. Z. J. Phys. Chem. 2006, 16819.
- [0094] . Onda, K. ;Li, B. ;Zhao, J. ;Jordan, K. D. ;Yang, J. ;Petek, H. Science 2005, 308, 1154.
- [0095] . Heimburg, T. ;Marsh, D. Biophys. J. 1993, 65, 2408.
- [0096] . Pinheiro, T. J. T. ; **Elöve**, G. A. ;Watts, A. ;Roder, H. Biochemistry. 1997, 36, 13122.
- [0097] . Sanghera, N. ;Pinheiro, T. J. T. Protein Sci. 2000, 9, 1194.
- [0098] . Paquet, M-J. ;Laviolette, M. ;Pézolet, M. ;Auger, M. Biophys. J. 2001, 81, 305.
- [0099] . Shinohara, H. ; **Grätzel**, M. ;Vlachopoulos, N. ;Aizawa, M. Bioelectrochem. Bioenerg. 1991, 26, 307.
- [0100] . Baglioni, P. ;Fratini, E. ;Lonetti, B. ;Chen, S. H. J. Phys ;Condens. Matter. 2004, 16, s5003.
- [0101] . Bard, A. J. ;Faulkner, L. R. Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications, 2nd ed ;Wiley ;New York, 2001.
- [0102] . Barker, P. D. ;Mauk, A. G. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 3619.
- [0103] . Perroud, D. T. ;Bokoch, P. M. ;Zare, N. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005, 102, 17570.
- [0104] . Stellwagen, E. Nature 1978, 275, 73.

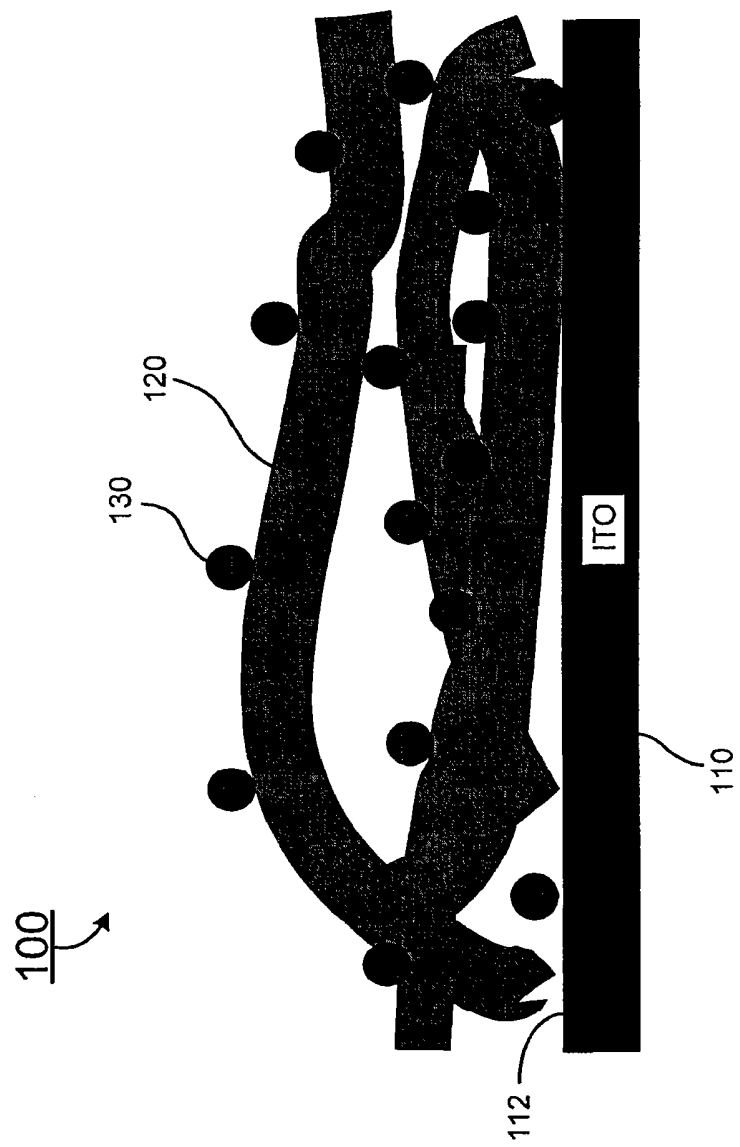


图 1

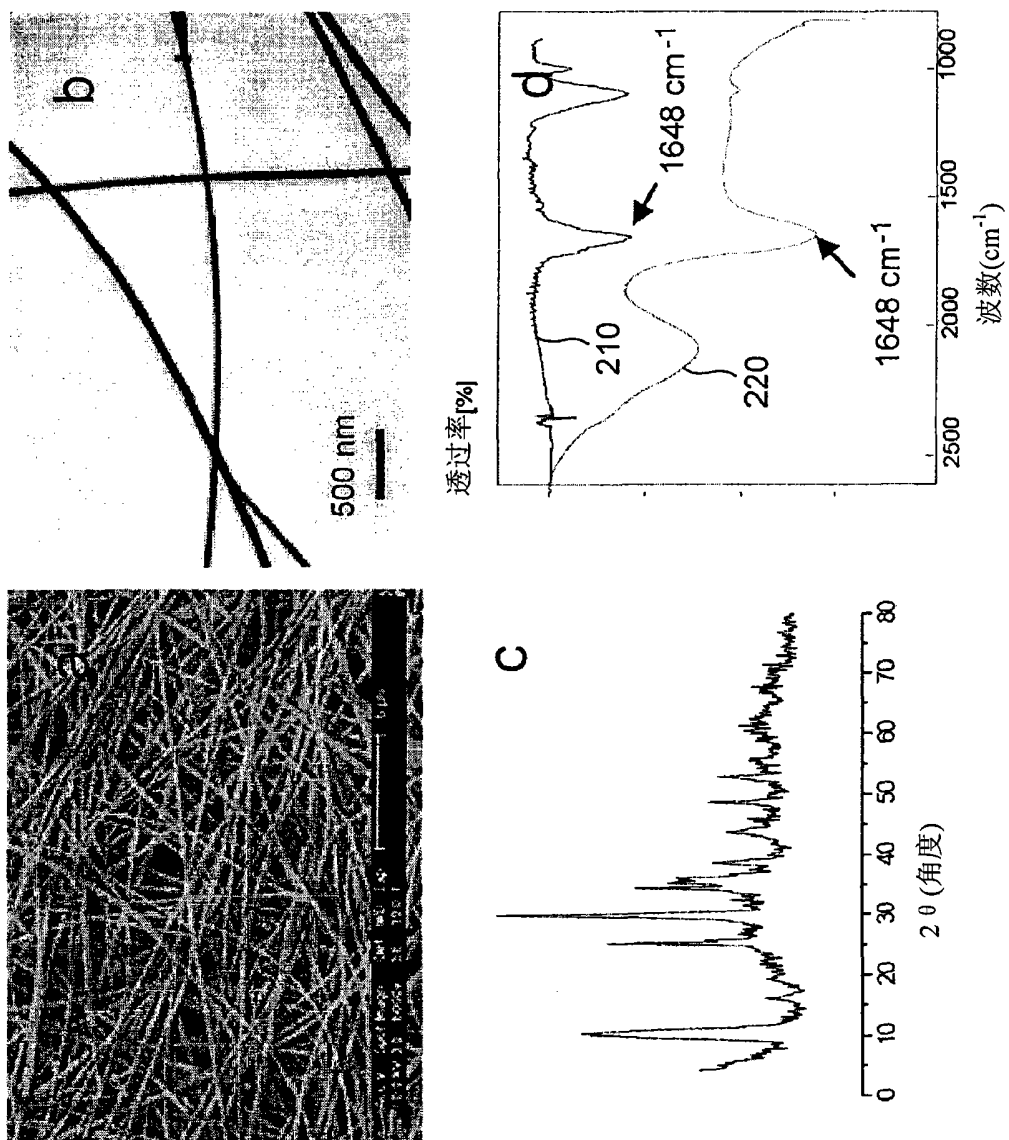


图 2

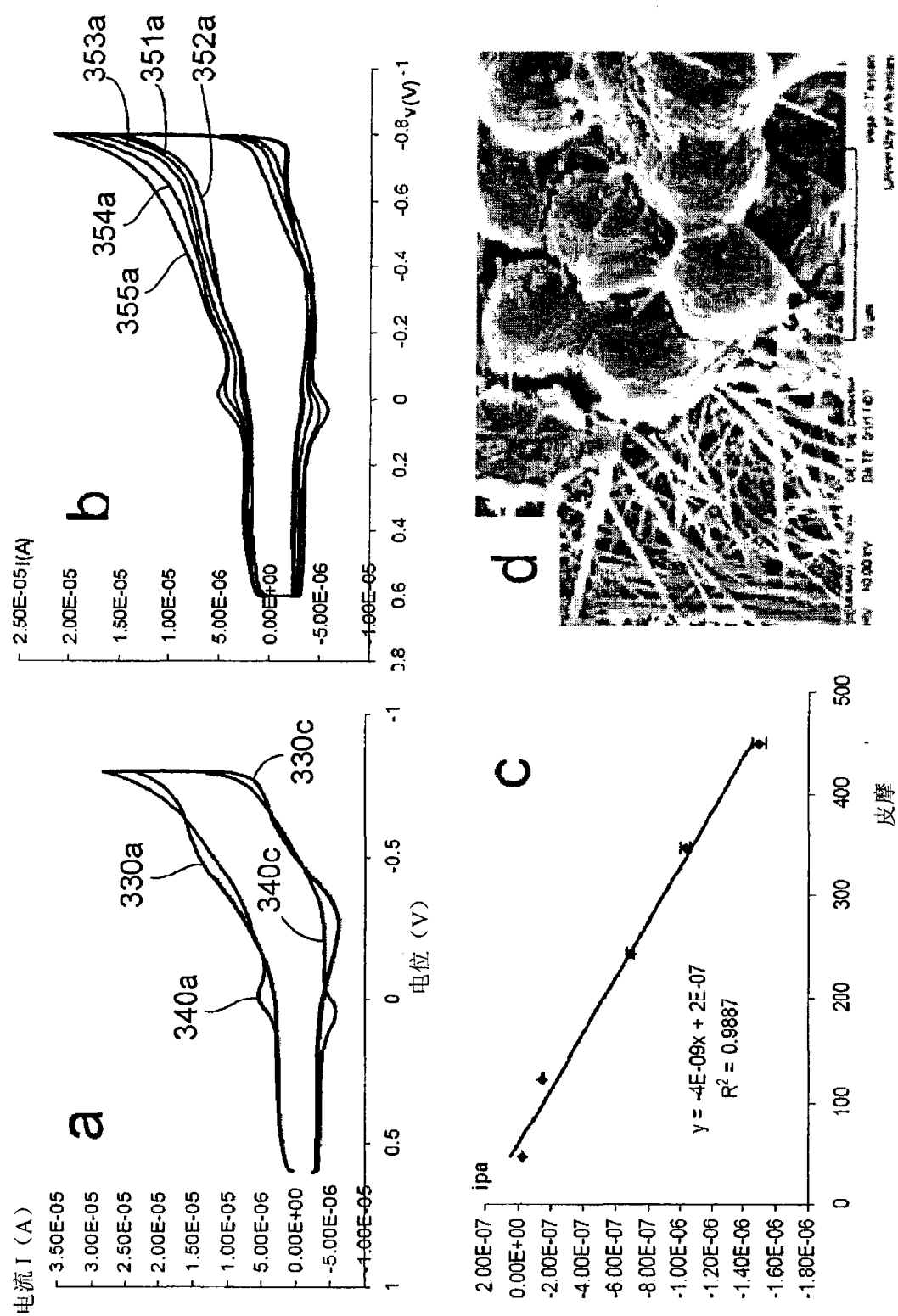


图 3

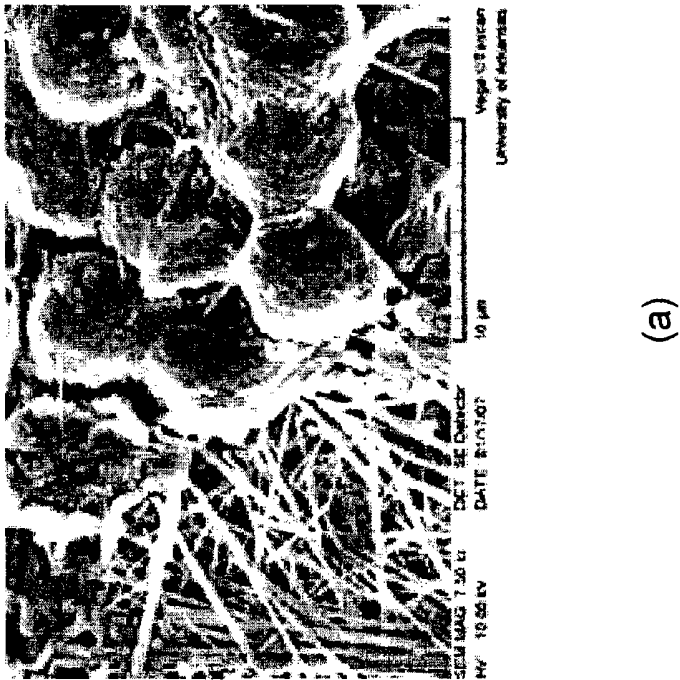
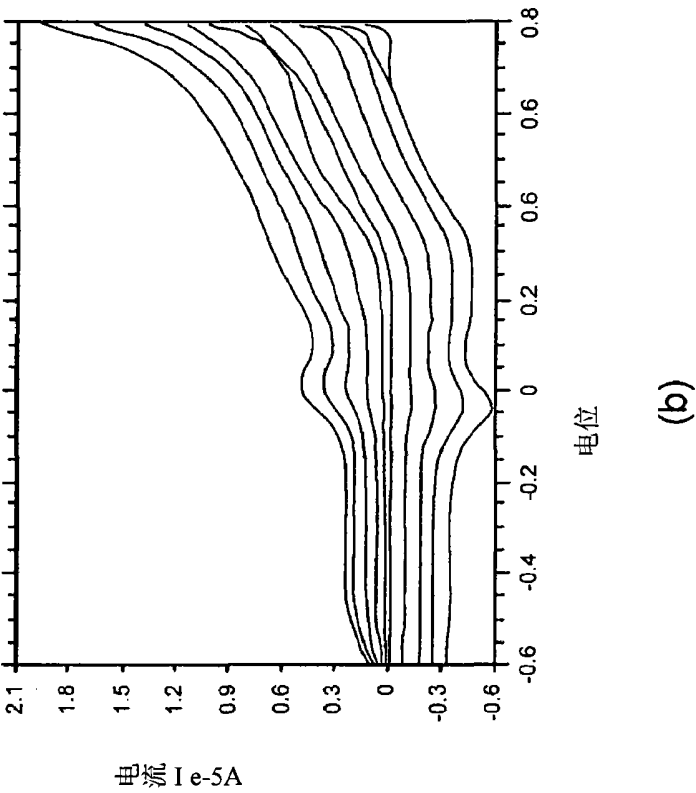


图 4

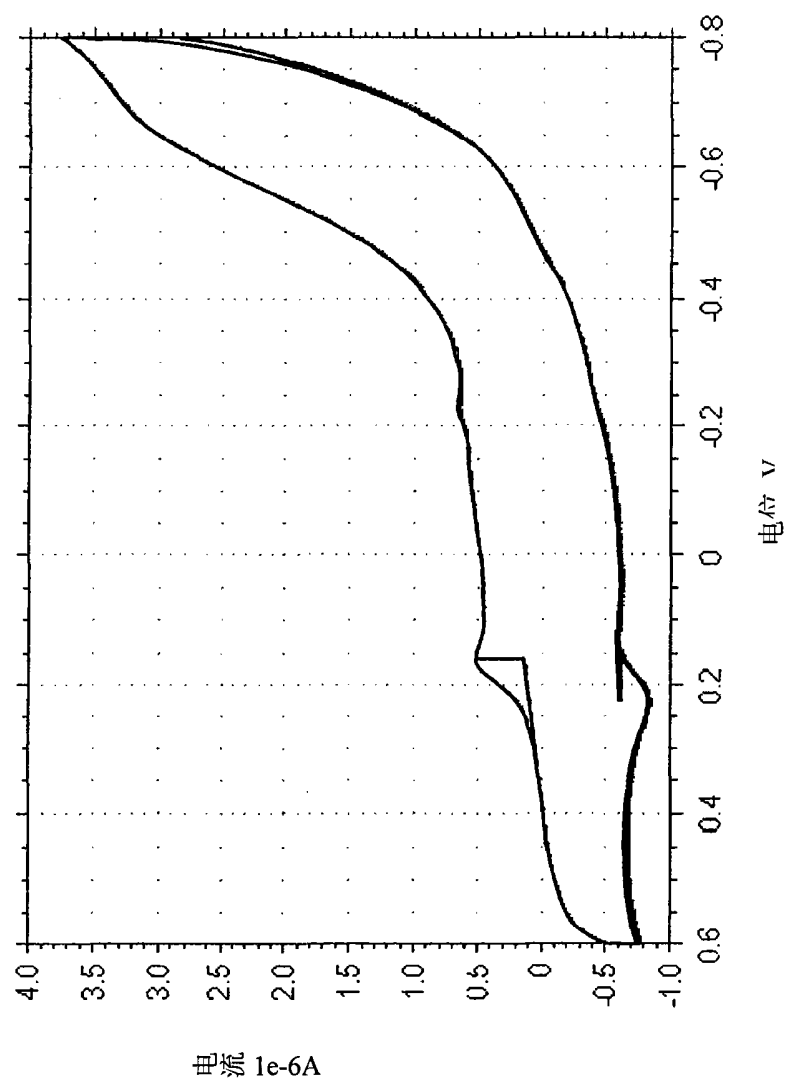


图 5

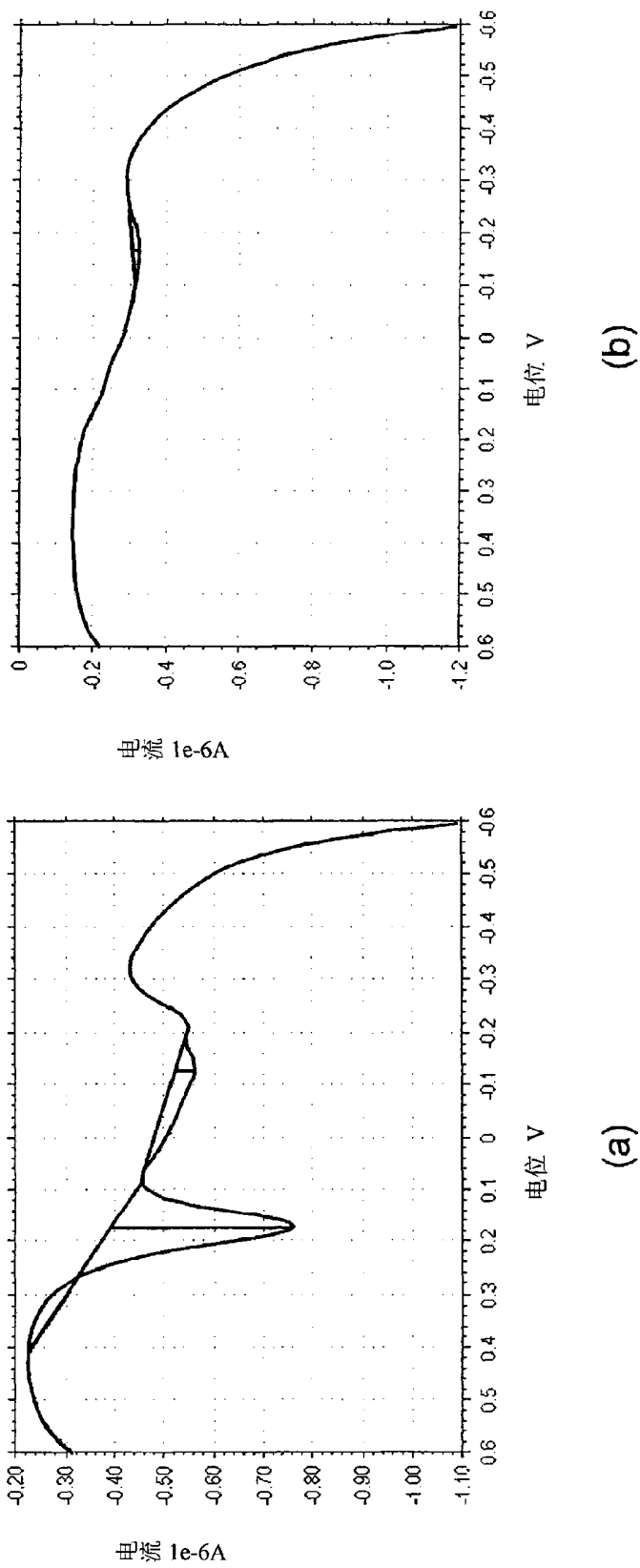


图 6